Untersuchungen zum Mechanismus der L-Agglutination

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Stefan von Fragstein

Saarbrücken

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. Zimmermann

Untersuchungen zum Mechanismus der L-Agglutination

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Stefan von Fragstein
geb. am 28.9.1948 in Köln

Dekan: Prof. Dr. med. G.A. Jutzler
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 6.12.1973 abgelegt.

Inhaltsübersicht

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 5

1. Seren 5
2. Streptokokken-L-Agglutination 5
3. Latex-Test 6
4. Gelfiltration 7
5. Eiweißbestimmung 9
6. Fraktionierung 9
7. Konzentrierung 9
8. Mercaptoäthanolbehandlung 1o
9. Absorption mit Streptokokken 1o

III. Ergebnisse 11

1. Serumtrennungen 11
2. Latex-Test der Fraktionen 11
3. Mercaptoäthanolbehandlung der Vollseren 11
4. L-Agglutination der Fraktionen 12
5. Substitutionsversuche an Vollseren 13
6. Absorptionsversuch mit Streptokokken 14
7. Einfluß von IgM und IgG auf die Titerhöhe der L-Agglutination 15

IV. Diskussion 16

V. Zusammenfassung 23

VI. Abbildungen 24

VII. Literaturliste 33

I. Einleitung

Seit den Untersuchungen von Cecil, Nicholls und Stainsby (1,2,3) ist bekannt, daß Seren von Patienten mit chronischer Polyarthritis in hohem Prozentsatz lebende und abgetötete Streptokokken der Gruppe A agglutinieren. Eine statistisch hochsignifikante Korrelation zwischen dem serologischen Befund eines Streptokokken-agglutinierenden Faktors und der klinischen Diagnose einer primär chronischen Polyarthritis konnte nie ernsthaft in Zweifel gezogen werden. Auch neuere Untersuchungen(4,5,6) zeigen eine hohe Konkordanz zwischen der L-Agglutination einerseits und sicheren Rheumafaktornachweisen andererseits wie der Hämagglutinationsreaktion und dem Latextropfentest.

Wenn die L-Agglutination trotzdem seit der Einführung der Hämagglutination(7), ihrer Modifikationen(8,9,1o) sowie der Rheumafaktornachweise mittels Gammaglobulin-beladener Latexpartikel(11) an Interesse verloren hat, so mag das daran liegen, daß ihr Reaktionsmechanismus bis heute umstritten ist, und selbst die Frage, ob der Rheumafaktor an der Agglutination beteiligt ist, noch unterschiedlich beantwortet wird.

In Tierversuchen sah Kalbak positive Agglutinationsreaktionen nach Immunisierung mit Streptokokken(12). Er schloß daraus, daß auch der Agglutination mit PCP-Seren eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion, erklärbar mit früheren Streptokokkeninfekten, zugrunde liegt. Auch Winblad und Edström(13) glaubten an eine spezifische Reaktion. Andererseits war bekannt, daß nicht nur Streptokokken durch Seren von chronischer Polyarthritis agglutiniert werden, sondern auch Staphylokokken, Pneumokken, Enterokokken, Proteus und andere (14,15,16,17,18,19). Dies scheint mehr für eine unspezifische Reaktion zu sprechen. Oker-Blom vermutete, daß der Rheumafaktor die Streptokokkenagglutination auslöse(16).

Lamont-Havers kam mit seinen Versuchsanordnungen zu interessanten Ergebnissen und damit zu einer neuen Theorie der L-Agglutination, die frühere Widersprüche erklären konnte(2o). Danach sind an der Streptokokkenagglutination zwei Faktoren beteiligt - einerseits ein nur im Serum chronischer Polyarthritiden vorkommender Faktor, der zusammen mit dem hämagglutinierenden Faktor der Waaler-Rose-Reaktion im Kältepräzipitat(21) des Serums auftritt, andererseits ein im Überstand der Kältepräzipitation vorhandener Faktor, der durch Normalseren ersetzbar ist und damit nicht spezifisch für PCP ist. Auch zum Reaktionsverlauf führte Lamont-Havers Versuche aus(2o). Der unspezifische Faktor ließ sich rasch und vollständig mittels Absorption mit gewaschenen Streptokokken aus dem Rheumatikerserum entfernen. Der spezifische Faktor dagegen zeigte nach der Entfernung des unspezifischen aus dem Reaktionssystem kaum Neigung, sich mit den Streptokokken zu verbinden. Nur bei längerer Inkubation und gleichzeitiger Anwesenheit des unspezifischen ließ auch der spezifische Faktor eine Affinität zu den Streptokokken beobachten. Müller, der mit eigenen Untersuchungen(4) diese Befunde in vollem Umfang bestätigen konnte, interpretierte sie folgendermaßen: Die Streptokokken, die in dem zu testenden PCP-Serum suspendiert werden, beladen sich zunächst mit dem unspezifischen Faktor, der eine hohe Affinität zu ihnen besitzt, sie jedoch nicht zu agglutinieren vermag. Der spezifische Faktor, den Müller identisch mit dem Rheumafaktor hält, tritt hinzu und agglutiniert das System. Mit einer Reihe interessanter Versuche(4) gelang es Müller sehr wahrscheinlich zu machen, daß es sich bei dem sog. spezifischen Faktor der L-Agglutination um den Rheumafaktor handelt, und daß der sog. unspezifische Faktor ein inkompletter auch im Serum Gesunder vorkommender Streptokokkenantikörper ist.

Die Zweifaktortheorie Lamont-Havers(2o), ergänzt durch die Befunde Müllers(4), schien alle beobachteten Phänomene in befriedigender Weise zu erklären und blieb lange unangefochten.

Erst in neuerer Zeit berichtete Knöll(22) von Versuchen, die sich nicht mit der Annahme zweier Faktoren in Einklang bringen lassen. Mit SF 13o absorbierte PCP-Seren blieben auch nach Substitution mit Normalseren negativ. Ferner konnte er mit dem Überstand der Kältepräzipitation allein den Orginaltiter erreichen. Aus weiteren Versuchen schloß er, daß an der Agglutination nur ein Faktor beteiligt ist, und daß es sich bei diesem um einen typenspezifischen Antikörper gegen das T1-Antigen des genannten Streptokokkenstammes handelt.

Reaktionsmechanismus und Beteiligung des Rheumafaktors bleiben also umstritten. Es stellt sich die Frage, in welcher Fraktion oder welchen Fraktionen die agglutinierende Aktivität zu lokalisieren ist, wenn verbesserte und eindeutigere Methoden der Serumtrennung wie z.B. die Gelfiltration eingesetzt werden. Die Filtration an Sephadex G 2oo erlaubt die Trennung eines Serums in Makroglobulin(19 S), leichtes Gammaglobulin(7 S) und Albumin. Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit galt nun folgenden Fragen:

1. Ist mit einer der drei durch Gelfiltration erhaltenen Serumfraktionen eine Streptokokkenagglutination zu erzielen oder bedarf es dazu mehr als einer Fraktion?
2. Ist die rheumafaktorhaltige Makroglobulinfraktion zur Streptokokkenagglutination notwendig, d.h. enthält sie den oder einen der auslösenden Faktoren?
3. Fallen die Untersuchungen für eine größere Zahl von Seren gleichsinnig aus oder reagieren verschiedene Seren verschieden?

Anmerkung: Die Untersuchungen wurden mit dem in unserer Rheumaroutine benutzten Streptokokkenstamm SF 13o durchgeführt. Nach Abschluß des experimentellen

Teils der Arbeit stellte sich heraus, daß unser Stamm zwar der Gruppe A angehört, seine typenspezifischen Antigene M,T und R aber verloren hat. Dies wird in der Diskussion berücksichtigt.

II. Material und Methoden

1. Seren

Untersucht wurden inaktivierte Seren aus den Einsendungen von vier Einzugsgebieten. 25 Seren, alle positiv im RA-Test[1], zeigten in der L-Agglutination Titer von 1:4o bis 1:8o. An diesen als Kollektiv I bezeichneten Seren sowie an einem weiteren, das durch einen besonders hohen Titer auffiel, wurden die Hauptuntersuchungen durchgeführt. Eine zweite Gruppe von 29 Seren, im RA-Test ebenfalls ausnahmslos positiv, wies in der Streptokokkenagglutination schwache Titer auf oder war negativ (Kollektiv II). Eine dritte Gruppe von Seren, negativ sowohl im Latex-Test wie in der L-Agglutination, wurde zu Substitutionsversuchen herangezogen.

2. Streptokokken-L-Agglutination

a.Bouillon: Als Nährmedium verwandten wir eine selbst hergestellte Rindfleischbouillon folgender Zusammensetzung: 75og gehacktes Rindfleisch werden mit 1,5l dest. Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wird die Mischung 15 Min. gekocht, durch Filterpapier filtriert, mit 5 n NaOH auf pH 8,o eingestellt und erneut 3o Min. gekocht. Zu 5ooml dieser Fleischextraktbrühe gibt man 5g Pepton und 2,5g NaCl und kocht sie wieder auf. Danach wird der pH erneut auf 8,o eingestellt. Man filtriert in Flaschen und autoklaviert 2o Min. bei 12o Grad. Nach der Autoklavierung muß der pH bei 7,6 - 7,8 liegen.
b.Puffer: Zur Serumverdünnung wird üblicherweise o,3 %iges NaCl benutzt(24). In Vorversuchen sahen wir bei Verwendung von o,3- und o,9 %iger NaCl-Lösung sowie von phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) völlig übereinstimmende Ergebnisse. Daher stellten wir der Einfachheit halber mit PBS, die wir

---

1) Rheumatoid Arthritis Test = Latex-Test

als Elutionsmittel in der Gelfiltration einsetzten, auch die Verdünnungsreihe für die L-Agglutination her.

Zusammensetzung von PBS

A	NaCl	8,0g	B	CaCl	1,0g
	KCl	2,0g		Aqua bidest.	1000,0ml
	$Na_2HPO_4 2H_2O$	14,0g	C	$MgCl_2 6H_2O$	1,0g
	KH_2PO_4 H_2O	2,0g		Aqua bidest.	1000,0ml

80ml A + 100ml B + 100ml C + 720ml Aqua bidest. = PBS

Einer Serumverdünnungsreihe mit 0,5ml von 1:10,1:20,1:40 etc. wurden pro Röhrchen 0,5ml Streptokokkenbouillon zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden im Wasserbad bei 52 Grad belassen. Über Nacht wurden die Röhrchen bei +4 Grad aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde im Agglutinoskop (Lupenvergrößerung) abgelesen und wie folgt bewertet:

Stärke 1: diffuse, kleinkörnige Trübung, keine echte Agglutination

Stärke 2: mittelgroße Partikel, überstehende Flüssigkeit klar, deutliche Agglutination

Stärke 3: große Partikel, starke Agglutination

Stärke 4: zusammenhängender Niederschlag auf dem Boden des Röhrchens, beim Schütteln lösen sich gröbere Fetzen, sehr starke Agglutination

Ab Stärke 2 wurde als positiv bewertet. Ein Titer von 1:10 (Agglutinationsstärke 2 oder mehr) galt als positiv.

3. Latextropfentest (Rheumatoid Arthritis Test)

Wir führten ihn auf Glastüpfelplatten mit Reagenzien der Hyland Laboratories aus. Zu einem Tropfen Serumverdünnung 1:20 gibt man einen Tropfen der mit menschlichem Gammaglobulin beladenen Latexsuspension und liest nach 3 Min. Schütteln mit dem bloßen Auge ab. Positives und negatives Kontrollserum erleichtern die Ablesung. Die Bewertungen sind: schwach +, mittelstark ++ und stark +++.

4. Gelfiltration

a.Vorbemerkungen: Sephadex G 2oo ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Polysaccharidketten. G 2oo hat den kleinsten Vernetzungsgrad in der Reihe der Sephadex-Gele und eignet sich zur Trennung makromolekularer Substanzen. Es wirkt als Molekularsieb und läßt, scheinbar paradox, zuerst die Komponente mit dem höchsten Molekulargewicht durchtreten, während es die leichteren Komponenten länger zurückhält. Liegt eine Substanz außerhalb der oberen Ausschlußgrenze des Gels, wie in unserem Fall die Makroglobuline des Serums, so wandert die Substanz ohne Verzögerung mit der Front des Elutionsmittels durch die Säule.

Die fortlaufend gemessene Extinktionskurve des Eluats ist bei einer Serumtrennung an Sephadex G 2oo dreigipflig. Der erste Gipfel enthält im wesentlichen α_2-Makroglobulin, hochmolekulares $\alpha - \beta$-Lipoprotein und β_2-Makroglobulin (19-S-Globulin = IgM), der zweite γ-Globulin vom 7-S-Typ (z.B. IgG), der dritte schließlich Albumine sowie α_1- und α_2-Globuline(25).

Die Qualität der Trennung hängt von mehreren Faktoren ab. Vorausgesetzt Gelsorte und ionale Zusammensetzung des Puffers wurden der Aufgabe entsprechend gewählt, so bleiben drei Faktoren von Bedeutung: Säulenlänge, Packung der Säule und Elutionsgeschwindigkeit.
Säulenlänge: Um eine vorgegebene Probe befriedigend zu trennen, muß eine bestimmte Menge Gel zur Verfügung stehen. Außerdem muß die Probe eine ausreichende Zeit mit dem Gel in Kontakt stehen, das heißt, die Elutionsgeschwindigkeit darf nicht zu hoch sein. Ist ein richtiges Verhältnis zwischen Gelmenge und Elutionsgeschwindigkeit gefunden, so kann durch Verlängerung der Gelsäule die Trennung verbessert werden. Die Verlängerung der Säule findet ihre Grenzen einerseits im apparativen Aufwand, andererseits da, wo die zu trennende Substanz im Elutionsmittel so verdünnt wird, daß

sie nicht mehr zu messen ist bzw. ihre Einengung zu aufwendig wird.
Elutionsgeschwindigkeit: Sie muß mit der Gelmenge abgestimmt werden. Ist sie zu hoch, leidet die Qualität der Trennung. Außerdem besteht die Gefahr, daß sich die Gelsäule während der Trennung senkt. Der Elutionsmittelfluß kann durch eine der Säule nachgeschaltete Pumpe auf einem niedrigen konstanten Wert gehalten werden.
Packung der Säule: Das Gel nimmt beim Quellen in einem mit PBS gefüllten Becherglas innerhalb weniger Minuten ein festes Volumen ein, das sich unter gleichen Bedingungen nicht mehr ändert. Im Chromatographierohr sinkt dagegen in den ersten Stunden der Gelspiegel, das heißt, die Dichte der Packung nimmt zu. Wird gleich nach der Säulenfüllung eine Pumpe angeschlossen, die den Durchfluß drosselt, so stabilisiert sich der Gelspiegel schnell, das Volumen verringert sich nur wenig. Begrenzt dagegen die Pumpe den Durchfluß nicht, so fließt aus dem geöffneten Bodenventil sehr viel mehr Elutionsmittel, die Säule senkt sich wesentlich stärker, und die Packung wird dichter. In unseren Versuchen schlossen wir die Pumpe gleich nach Säulenpackung an.

b.Versuchsbedingungen: Wir wählten für unsere Untersuchungen eine Säule von 2,5 x 1oo cm der Firma Pharmacia (Uppsala). Das Rohr ist an beiden Enden dicht verschließbar und mit Regulierventilen versehen, die den Anschluß von Teflonschläuchen (Durchmesser etwa 1mm) gestatten. Die Gelsäule ruht auf einem im Boden des Rohres ausgespannten Nylonsieb (Porenweite 2oμ). Dadurch werden die Gelpartikel zurückgehalten, während das Eluat ungehindert durchfließt. Bei der absteigenden Trennung, die wir durchführten, wird ferner ein Auftragbecher benutzt. Sein Boden, ein Nylonsieb der beschriebenen Art, liegt dem oberen Gelspiegel an und ermöglicht ein schnelles Auftragen der Probe, ohne daß Gelpartikel aufgewirbelt werden. Mit einer Perpex Peristaltic Pump(LKB) hielten wir den Elutionsmittelfluß in allen unseren Serumtrennungen konstant auf 2oml pro Std.

Die nicht verzögerte Makroglobulinfraktion braucht für die Sephadex-Passage etwa 1o Std.. Nach weiteren 1o Std. sind die Albumine vollständig eluiert. Die Volumina der aufgetragenen Seren betrugen 1 - 2ml.

Ein Arbeitsgang sieht folgendermaßen aus: Das Rohr wird oben geöffnet und das über dem Boden des Auftragbechers stehende Elutionsmittel abgesaugt. Nun wird die unverdünnte Serumprobe in den Becher gegeben. Ist das Serum vollständig in das Gel eingedrungen, wird die Säule wieder randvoll mit Puffer gefüllt - der Auftragbecher bleibt auf der Geloberfläche liegen - und verschlossen. Über einen Teflonschlauch kann durch das obere, geöffnete Ventil ständig PBS nachfließen. Das am Bodenventil austretende Elutionsmittel mit den getrennten Eiweißkomponenten wird über Teflonschläuche zuerst der Pumpe, dann, zur Eiweißbestimmung, einem automatischen UV-Absorptionsmesser und schließlich einem Fraktioniergerät zugeleitet.

5. Eiweißbestimmung

Mit einem Uvicord der Firma LKB wurde die Extinktion des Eluats alle 2o sec. gemessen und als Zeitfunktion geschrieben. Das Eluat fließt durch eine Quarzzelle (Vol. o,3ml), die sich im Strahlengang eines UV-Lichtes von 28omμ befindet. Der Meßwert wird über den Steuerteil des Gerätes einem Schreiber mitgeteilt, der ihn auf einer Skala anzeigt und als Funktion der Zeit ausdruckt (Abb.1,2).

6. Fraktionierung

Mit dem Fraktionator simplex der Firma Braun (Melsungen) sammelten wir pro 2 Std. 5 Fraktionen zu je 8ml.

7. Konzentrierung

Diejenigen Fraktionen, welche die IgM- bzw. die IgG-Komponente

enthielten, wurden zusammengegeben. Fraktionen aus dem Zwischenbereich der Peaks wurden verworfen. Die auf diese Weise erhaltenen IgM- und IgG-Pools wurden mittels Ultrafiltration so eingeengt, daß die in die L-Agglutination eingehenden Konzentrate eine o,1 - o,2ml Serum entsprechende Menge an Immunglobulinen enthielten.

8. Mercaptoäthanolbehandlung

Durch Behandlung mit Mercaptoäthanol lassen sich schwere und leichte Immunglobuline unterscheiden. IgM verliert durch Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken seine serologische Aktivität, IgG wird nicht angegriffen.
1:5 verdünntes Serum wird mit dem gleichen Volumen o,2 m Mercaptoäthanol versetzt und drei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wird 24 Std. bei +4 Grad gegen dreimal gewechselte PBS-Lösung dialysiert.

9. Absorption mit Streptokokken

Aus 5ml einer Streptokokkenbouillon, die 16 Std. bei 37 Grad bebrütet wurde, werden durch Zentrifugation die Streptokokken gewonnen und dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach werden sie in o,5 - 1,o ml des zu absorbierenden Serums suspendiert und zwei Stunden im Wasserbad bei 37 Grad inkubiert. Diese Streptokokken-Serum-Suspension wird über Nacht bei +4 Grad aufbewahrt, am nächsten Tag zentrifugiert und der klare Serumüberstand gewonnen. Er wird wieder mit gewaschenen Streptokokken inkubiert und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird zentrifugiert und der nun zweifach mit Streptokokken absorbierte Serumüberstand bei den entsprechenden Versuchen eingesetzt.

III. Ergebnisse

1. Serumtrennungen

Abb. 1 zeigt ein typisches Trennungsbild. Auch die anderen Seren des Kollektivs I zeigten, von quantitativen Unterschieden abgesehen, ähnliche Ergebnisse. Ein Serum (Abb.2) machte eine Ausnahme. Zwischen 19-S- und 7-S-Komponente war ein zusätzlicher Gipfel angedeutet. Ein Vergleich der Abb.1 und 2 - die Abszisse hat den gleichen Zeitmaßstab - zeigt die zeitliche Übereinstimmung der drei IgM, IgG und Albumin darstellenden Hauptgipfel[2]. Der Zwischengipfel im Serum der Abb.2 ist vermutlich der Ausdruck eines besonders hohen Gehalts an Intermediärkomplexen (26,27,28), die in ihrem Molekulargewicht zwischen IgM und IgG stehen.

2. Latex-Test der Fraktionen

Die IgM-Fraktionen der Seren aus Kollektiv I waren im Latex-Test ausnahmslos positiv. Durchgehend negativ waren die Albuminfraktionen. In 5 Fällen waren die IgG-Fraktionen schwach oder mittelstark positiv (Abb.3, obere Ordinate).

3. Mercaptoäthanolbehandlung der Vollseren

Nach Ausschaltung der schweren Immunglobuline durch Mercaptoäthanol zeigten noch 5 Seren aus Kollektiv I einen positiven Latex-Test. Die übrigen verloren ihre Fähigkeit, die Latex-Suspension zu agglutinieren (Abb.3, untere Ordinate). Von diesen 5 gegen Mercaptoäthanol resistenten Rheumaseren waren 3 mit den unter III,2 genannten 5 Seren identisch (Abb.3). 58 weitere latexpositive Seren wurden der Mercaptoäthanolreduktion unterzogen. 15 von ihnen agglutinierten danach noch die Latex-Suspension, alle übrigen waren negativ geworden.

---

2) Die zuerst eluierte Serumfraktion wird im folgenden Text vereinfachend als IgM-Fraktion, die zweite als IgG-Fraktion und die dritte als Albuminfraktion bezeichnet. Alle drei Fraktionen enthalten jedoch auch noch andere Proteine(II,4).

4. L-Agglutination der Fraktionen

Abb.4 veranschaulicht das Verhalten der Serumfraktionen aus Kollektiv I in der L-Agglutination. Die reinen IgM-Fraktionen waren ausnahmslos negativ (Kurve d). Bei den IgG-Fraktionen zeigten sich dreimal Titer von 1:1o, alle übrigen waren negativ (Kurve c). Mit der kombinierten IgM- und IgG-Fraktion wurden in 2o Fällen positive Titer erzielt. 5 Seren blieben negativ (Kurve b). Kurve a zeigt im Vergleich dazu die Orginaltiter der Vollseren.

Tabelle 1	Titer IgM + IgG	Zahl der Seren
	gleich oder höher	5
	1 Stufe niedriger	1o
	2 Stufen niedriger	4
	3 oder mehr Stufen niedriger	6
	davon negativ	5
	Summe	25

Dem Orginaltiter ähnliche Werte waren also weder mit der reinen IgM-Fraktion noch mit der IgG-Fraktion zu beobachten, wohl aber in den meisten Fällen mit der Kombination beider. Ein einziges der insgesamt 26 an der Gelsäule getrennten Seren fiel aus dem Rahmen. In wiederholten Versuchen zeigte seine Makroglobulinfraktion alle in Titer von 1:16o oder 1:32o. Die anderen Fraktionen waren negativ. Im Latex-Test erwies sich das Serum als negativ.

Die IgM-Fraktionen aus 11 Seren des Kollektivs I substituierten wir mit o,2ml geeignetem Normalserum und testeten sie in der L-Agglutination. Abb.5 zeigt die mit Eigensubstitution

(IgM + eigenes IgG) erzielten Werte(1.Säule) im Vergleich mit den durch Fremdsubstitution (IgM + Normalserum) erreichten Werten(2.Säule). Die IgM-Fraktionen aus 1o Seren des Kollektivs I (teilweise identisch mit den oben genannten 11 Seren) substituierten wir mit einer o,2ml Serum entsprechenden Menge IgG aus geeigneten Normalseren. Eigen- und Fremdsubstitution dieser Seren zeigt im Vergleich die Abb.6. Wie aus den Abb.5 und 6 ersichtlich, tritt nur in wenigen Fällen mit Fremdsubstitution ein höherer Titer auf. Weiterhin verhalten sich die Substitution mit fremdem Serum bzw. mit fremdem IgG gleichsinnig, soweit die gleichen Seren mit beiden Verfahren untersucht wurden.

Schließlich versuchten wir auch die Substitution reiner IgM-Fraktionen mit standardisierter IgG-Lösung. Dabei wurden IgG-Standards der Firma Behring eingesetzt, wie sie in der Partigen-Immundiffusion benutzt werden. Mit einer o,o2ml Serum entsprechenden Menge IgG-Standard erzielten wir in den beiden untersuchten Fällen Titer, die denen der Eigensubstitution vergleichbar waren.

5. Substitutionsversuche an Vollseren

Von 29 Seren(Kollektiv II), die im Latex-Test positiv, in der L-Agglutination schwach oder negativ waren, wurden je zwei Verdünnungsreihen hergestellt. Die erste Reihe entsprechend der Orginal-L-Agglutination, die zweite erhielt darüber hinaus zusätzliches IgG aus einem Pool geeigneter Normalseren, und zwar eine Menge, die ungefähr o,1ml je Röhrchen entsprach. Abb.7 zeigt die ohne IgG-Zusatz erreichten Titer(Kurve a) im Vergleich mit den durch IgG-Substitution erzielten Werten(Kurve b).

Tabelle 2 Titer von o,1ml Serum + o,1ml Fremd-IgG im Vergleich zu o,1ml Serum allein.

Titer	Zahl der Seren
1 Stufe niedriger	1
gleich	18
1 Stufe höher	8
2 Stufen höher	2
Summe	29

Wie aus Abb.7 sowie aus Tab.2 ersichtlich ist, findet sich bei etwa einem Drittel der Seren eine Steigerung des L-Agglutinationstiters, meist allerdings nur in mäßigem Grade. Auch ein Vergleich der Agglutinationsstärke(II,2) entsprechender Röhrchen aus substituiertem und nicht substituiertem Kollektiv fiel zugunsten des Ersteren aus. Hier war die Agglutination 7x um einen Grad und 3x um zwei Grade stärker. Nur in einem Fall trat im nicht substituierten Kollektiv ein stärkerer Agglutinationsgrad als im substituierten Kollektiv auf.

6. Absorptionsversuche mit Streptokokken

8 Seren des Kollektivs I wurden zweimal mit Streptokokken absorbiert. In der L-Agglutination untersucht wurden a. das Nativserum, b. dasselbe nach Absorption, c. und d. absorbiertes Serum, substituiert mit Normalserum bzw. Normal-IgG und e. in 2 Fällen zusätzlich auch mit Standard-IgG. Abb.8 zeigt, daß alle Seren nach der Absorption ihre Fähigkeit, Streptokokken zu agglutinieren, verloren hatten. Substitution mit Normalserum, Normal-IgG oder Standard-IgG verlieh den absorbierten Seren die alten oder vergleichbare Titer. Ein Serum blieb nach Substitution negativ.

7. Einfluß von IgM und IgG auf die Titerhöhe in der L-Agglutination

Abb.9 zeigt das Verhalten des Titers bei konstanter Menge IgM und wachsender IgG-Verdünnung (Punkte) sowie im umgekehrten Fall einer konstanten Menge IgG und zunehmender IgM-Verdünnung (Kreise). Dieser Versuch zeigt, daß offenbar beide Fraktionen in ähnlicher Weise den Ausfall der Reaktion bestimmen und die Titerhöhe limitieren. Es wurde allerdings nur ein Serum in dieser Weise untersucht.

IV. Diskussion

Die Diskussion umfaßt zwei Teile. Im ersten Teil werden die Versuchsergebnisse im Zusammenhang betrachtet und interpretiert. Sie erlauben es, auf die in der Einleitung gestellten Fragen klare Antworten zu geben. Die Befunde und die daraus gezogenen Konsequenzen gelten für den von uns benutzten Stamm, einen β-hämolytischen Streptokokkus der Gruppe A, der keine typenspezifischen Antigene besitzt. Im zweiten Teil der Diskussion werden die wichtigsten Befunde und Deutungen zur L-Agglutination dargestellt und verglichen. Auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen wird hingewiesen.

Die L-Agglutination der Fraktionen IgM und IgG sowie der Kombination beider(III,4) zeigt sehr deutlich, daß es zur Auslösung einer eindeutig positiven Reaktion beider Fraktionen bedarf. Es sind also zumindest zwei Faktoren beteiligt, die sich in ihrer Molekulargröße unterscheiden. Bei dem einen dürfte es sich um ein Makroglobulin vom 19-S-Typ, bei dem anderen um ein Gammaglobulin vom 7-S-Typ handeln.

Einige Seren verloren im Verlauf der Trennung ihre Fähigkeit, Streptokokken zu agglutinieren, gleichgültig ob IgM oder IgG oder IgM + IgG getestet wurde. Fast alle Seren, die nach der Trennung noch zu agglutinieren vermochten, reagierten gleichsinnig nach einem Zweifaktormechanismus. Immerhin zeigten drei Seren auch mit der bloßen IgG-Fraktion einen wenn auch zweifelhaften Titer(Abb.4). Ein einziges Serum(III,4) verursachte mit der IgM-Fraktion und nur mit dieser eine starke Agglutination. Da dieses Serum im Latex-Test aber negativ war, scheint die Beobachtung von geringem Wert. In aller Regel reagiert unser Streptokokkenstamm also nach einem Zweifaktormechanismus. Die Annahme liegt nahe, daß es sich bei diesen beiden Faktoren um die auch von Lamont-Havers und Müller(4,2o) beobachteten handelt.

Unser 7-S-Faktor läßt sich durch Normalserum, welches keine Streptokokken agglutiniert, ersetzen(III,4), entspricht also in dieser Eigenschaft dem Müllerschen unspezifischen Faktor. Ferner konnten wir in unseren Versuchen zeigen (III,4;Abb.6), daß sich der 7-S-Faktor des PCP-Serums auch durch die IgG-Fraktion von Normalseren sowie durch standardisierte Human-IgG-Lösungen ersetzen läßt. Dies steht im Einklang mit der Annahme Müllers, daß es sich bei dem unspezifischen Faktor um einen gewöhnlichen, in vielen Normalseren vorkommenden Streptokokkenantikörper handelt.

Bei der Betrachtung der Abb.5 und 6 fällt auf, daß eine ganze Reihe von IgM-Fraktionen mit Fremdsubstitution einen höheren Titer erbringen als mit Eigensubstitution. Schon Lamont-Havers hatte vermutet, daß der unspezifische Faktor in manchen Fällen limitierend in der L-Agglutination wirkt. Müller hatte dies in Versuchen bestätigen können und gefunden, daß verschieden PCP-Seren ebenso wie auch Normalseren offenbar ganz unterschiedliche Mengen an unspezifischem Faktor enthalten. Einige Normalseren eigneten sich überhaupt nicht zur Substitution, mit anderen wurde der Orginaltiter des Rheumaserums nicht erreicht, wieder andere verhalfen zu einem noch höheren Titer. Durch Zufügen von geeigneten Normalseren erreichte er teilweise Titererhöhungen um 1-2 Stufen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch wir in unseren Versuchen(III,5;Abb.7). Schließlich verhielten sich unsere Rheumatikerseren auch in ihrem Absorptionsverhalten Streptokokken gegenüber der Zweifaktortheorie Lamont-Havers und Müllers entsprechend. Die Versuche der genannten Autoren wurden um die Substitution mit Normal-IgG und Standard-IgG erweitert. Auch hiermit ließen sich die ursprünglichen Titer wiederherstellen(III,6;Abb.6).

In einem Versuch zum Einfluß der beiden Faktoren auf den Titer der L-Agglutination(III,7;Abb.9) beobachteten wir, daß offenbar auch der Makroglobulinfaktor den Titer limitieren

kann. Lamont-Havers und Müller(4,2o) hatten dies nicht beobachtet. Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden: An der Agglutination unseres Streptokokkenstammes sind zwei Faktoren beteiligt. Der eine taucht in der rheumafaktorhaltigen Makroglobulinfraktion der Geltrennung auf, der andere in der Fraktion der Gammaglobuline vom 7-S-Typ. Letzterer ist nicht spezifisch für PCP und in Normalseren in unterschiedlichen Mengen vorhanden. Ferner handelt es sich bei ihm um ein Immunglobulin der IgG-Klasse, wie die Substitutionversuche mit standardisierten Lösungen beweisen. Er läßt sich mit Streptokokken absorbieren und aus dem Serum entfernen. Unsere Faktoren verhalten sich also in allen entscheidenden Punkten analog zu denen, die Lamont-Havers und Müller beobachten konnten, und es besteht wenig Zweifel an ihrer Identität. Die Interpretation des schweren Faktors als Rheumafaktor und des leichten als inkompletten Streptokokkenantikörper nach Müller(4) darf auch für die Agglutination unseres Stammes gelten.

Von besonderem Interesse war nun die Frage, ob sich dennoch - vielleicht in wenigen Fällen - mit der bloßen IgG-Fraktion eine Agglutination erzielen ließe. Daß diese Vermutung nicht im Widerspruch zu stehen braucht zur Beteiligung des Rheumafaktors, soll folgende Überlegung zeigen. Der Rheumafaktor ist seit längerer Zeit als Makroglobulin bzw. Immunglobulin der IgM-Klasse charakterisiert(29,3o,31). In neuerer Zeit konnte aber auch Rheumafaktor vom 7-S-Typ nachgewiesen werden (28,32,33). Leichter Rheumafaktor wäre wie der unspezifische Faktor in der IgG-Fraktion der Geltrennung enthalten. Auf diese Weise könnte mit der IgG-Fraktion eine Agglutination nach dem Zweifaktormechanismus und unter Rheumafaktorbeteiligung zustande kommen. Dies würde insofern den Befunden Knölls(5) entsprechen, als die IgG-Fraktion zur Auslösung einer Agglutination genügte. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus wäre freilich ein anderer als der von ihm angenommene.

In unseren Versuchen erreichten nur drei der 26 getesteten IgG-Fraktionen einen zweifelhaft positiven Titer. Diese Fraktionen aber stammten aus Seren, die nach noch zu besprechenden Kriterien keinen leichten Rheumafaktor enthielten. Die Vermutung ließ sich also für unseren Streptokokkenstamm nicht bestätigen. Ob sie für andere Stämme zutrifft, wäre zu prüfen.

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, wie häufig überhaupt Rheumafaktor vom 7-S-Typ neben dem vom 19-S-Typ auftritt. Heimer und Levin(32) fanden bei hochtitrigen Rheumaseren in jedem Falle auch niedermolekularen Rheumafaktor. Chodirker und Tomasi(28) hatten Anhalt dafür, daß er nur in Rheumaseren mit besonders hohem Gehalt an Intermediärkomplexen vorkommt. Bach und Mitarbeiter(33) fanden ihn in einem kleinen Prozentsatz von PCP-Seren, aber auch in Seren alter Patienten ohne Rheumaanamnese. Als Kriterium für das Vorliegen von leichtem Rheumafaktor galt uns der Latex-Test der IgG-Fraktion sowie der Latex-Test der mit Mercaptoäthanol behandelten Vollseren. Erstaunlich ist, daß die beiden Methoden nicht zu völlig konkordanten Ergebnissen führten(III,2,3;Abb.3). Nach den vorliegenden Befunden wäre zu fordern, daß es leichten Rheumafaktor gibt, der gegen Mercaptoäthanol resistent ist und dennoch nicht in der IgG-Fraktion erscheint(Abb.3, Serum 28 und 74). Es wäre denkbar, daß leichter Rheumafaktor aggregiert und als Intermediärkomplex zwischen der IgM- und der IgG-Fraktion eluiert wird(Abb.1,2). Als solcher wäre er nicht in unserer IgG-Fraktion aufgetaucht, da wir das Eluat im Zwischenbereich der Fraktionen verworfen haben. Enge Beziehung zwischen dem Auftreten von Intermediärkomplexen und niedermolekularem Rheumafaktor wurde beobachtet(28).

Eine größere Zahl von Seren testeten wir nach der Mercaptoäthanolreduktion mit dem Latex-Test. Es stellt sich heraus, daß rund ein Viertel unserer rheumapositiven Seren neben dem

makromolekularen auch niedermolekularen Rheumafaktor besaß. Die Frage, ob ein Teil der Rheumaseren unter Mitwirkung des leichten Rheumafaktors allein mit der IgG-Fraktion Streptokokken agglutinieren kann, bleibt also weiterhin interessant, wenn man annehmen darf, daß der 7-S-Typ etwa in einem Viertel der Rheumaseren vorkommt.

Was läßt sich nun nach dem jetzigen Stand des Wissens zur Frage der Streptokokken-L-Agglutination sagen? Haben verschiedene Reaktionsmechanismen nebeneinander Gültigkeit? Taucht durch die vorliegende Arbeit ein neuer Gesichtspunkt auf? Die Ergebnisse Lamont-Havers und Müllers(4,2o) haben zu einer plausiblen Theorie der L-Agglutination geführt. Sie gibt einen sehr einleuchtenden Grund an für die unbestrittene Konkordanz der Agglutinationsreaktion zu den Rheumafaktortests - die Beteiligung des Rheumafaktors nämlich. Daß der Rheumafaktor die Streptokokkenagglutination auslöst, wurde vor allen Dingen aus zwei Gründen bezweifelt. Die L-agglutinierende Aktivität taucht bei der Papierelektrophorese nicht genau am Ort des Rheumafaktors auf, sondern bleibt in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit zurück (34,35,36). Die Absorption eines Serums mit Streptokokken der Gruppe A bedingt ein Negativwerden der Agglutination, während der Rheumafaktor weiterhin nachweisbar bleibt (2o,36,37). Beide Befunde erklären sich zwanglos aus der Zweifaktortheorie. "Der" Streptokokken agglutinierende Faktor ist in der Papierelektrophorese da lokalisiert, wo sich Makroglobuline und 7-S-Gammaglobuline mischen und nicht am Ort der höchsten IgM-Konzentration wie der Rheumafaktor(4). Das mit Streptokokken absorbierte Serum besitzt keinen unspezifischen Faktor mehr und kann Streptokokken folglich nicht mehr agglutinieren.

Die L-Agglutination würde also in die Gruppe der echten Rheumafaktornachweise eingereiht. Der größte Teil der Rheuma-

tests basiert auf folgendem Prinzip: Erytrozyten oder biologisch inerte Partikel, die als Indikator dienen, binden - spezifisch oder unspezifisch - Gammaglobulin an sich. Hinzutretender Rheumafaktor mit mehreren Bindungsstellen für Gammaglobulin bringt das System zur Agglutination, die dank der Indikatoren sichtbar ist. Durch Variation von Indikator und Gammaglobulin war man zu einer großen Zahl von mehr oder weniger gleichwertigen Rheumatests gekommen. Einige der Kombinationen sind: Schaferythrozyten mit Anti-Schafzell-Antikörpern vom Kaninchen(7), menschliche Erythrozyten mit inkompletten Rhesusantikörpern(38,39), mit Isoagglutininen des A-B-O-Blutgruppensystems(15), mit inkompletten Wärmeautoantikörpern(4) und schließlich sogar Latex-(11), Kollodium-(4o) und Acrylpartikel(41) mit menschlichem Gammaglobulin.

Nach dem gleichen Prinzip würde die L-Agglutination ablaufen. Indikatoren wären die Streptokokken; das Gammaglobulin, das sie an sich binden, wären die patienteneigenen inkompletten Streptokokkenantikörper, der unspezifische Faktor also. Auch die anderen Bakterienagglutinationen, die beobachtet wurden(14 - 19), würden sich im Sinne der Variation des Indikators und einer Beteiligung der jeweiligen Normalantikörper in dieses Bild fügen.

Knöll nun glaubte, nach seinen Versuchsergebnissen eine Rheumafaktorbeteiligung ausschließen zu müssen(22). Er stützte sich dabei auf seinen Befund, daß mit dem Überstand des Kältepräzipitates allein eine Streptokokkenagglutination zu erzielen war. Den auslösenden Faktor charakterisierte er anhand weiterer Versuche(23) als typenspezifischen Streptokokkenantikörper. Da eine Beteiligung von Streptokokken bei der primär chronischen Polyarthritis allgemein abgelehnt wird, vermutete er zunächst, daß Agglutinationen mit Stamm SF 13o Typ A1 bei chronischen Polyarthritiden nicht häufiger vorkommen als bei anderen Erkrankungen oder Gesunden. Seine

späteren Versuche bestätigten diesen Verdacht nicht(6); er fand die Agglutination auch dieses Stammes bei PCP signifikant erhöht im Vergleich zu anderen Erkrankungen. So schloß er, daß PCP-Kranke häufiger Infektionen mit A-Streptokokken durchgemacht haben müssen als andere Kranke oder Gesunde. Angesichts der experimentellen Befunde Müllers(4) wies er darauf hin, daß dieser mit einem A3-Typ gearbeitet habe. Unser β-hämolytischer Streptokokkus der Gruppe A besaß weder M- noch T-Antigene und reagierte wie der A3-Typ Müllers. Es fällt nicht leicht anzunehmen, daß gewisse Typen von Streptokokken (Typ A1) typenspezifisch und ohne Rheumafaktor reagieren, während andere(Typ A3) und solche ohne typenspezifische Antigene unter Beteiligung des Rheumafaktors reagieren. Einleuchtender wäre ein typenunspezifischer Reaktionsmechanismus mit Rheumafaktor für alle Streptokokken der Gruppe A.

Zu prüfen bliebe, ob für einen Teil der A-Streptokokken auch nach anderen Kriterien als dem der Kältepräzipitation die Mitwirkung des Rheumafaktors ausgeschlossen werden kann. Es scheint also ratsam, an einer größeren Zahl von Seren Streptokokken verschiedener Typen parallel zu testen. Um die Rolle des Rheumafaktors zu prüfen, sollte neben der Kältepräzipitation vor allen Dingen die Gelfiltration an Sephadex G 2oo und die Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten herangezogen werden.

V. Zusammenfassung

Der Mechanismus der L-Agglutination (= Agglutination lebender Bakterien, insbesondere Streptokokken der Gruppe A, durch Seren mit Rheumafaktor) wurde durch Auftrennung von Humanseren mittels Gelfiltration an Sephadex G 2oo untersucht. Hierbei ergab sich, daß an der L-Agglutination zwei Faktoren beteiligt sind: ein Makroglobulin, das nur in Seren von Patienten mit chronischer Polyarthritis (PCP-Seren) vorkommt, und ein 7-S-Globulin, das auch in Seren von Normalseren zu finden ist. Der zweite Faktor ist in der Agglutination durch 7-S-Fraktionen aus Normalseren und durch standardisierte IgG-Präparate ersetzbar. Mit Streptokokken absorbierte PCP-Seren wurden negativ in der L-Agglutination. Durch Zufügen von Normalseren, Normal-IgG oder standardisierten IgG-Präparaten wurden wieder Titer erreicht, die denen der Nativseren vergleichbar waren. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit gleichlautenden (4,2o) und gegensätzlichen Befunden(6,22,23) anderer Autoren diskutiert.

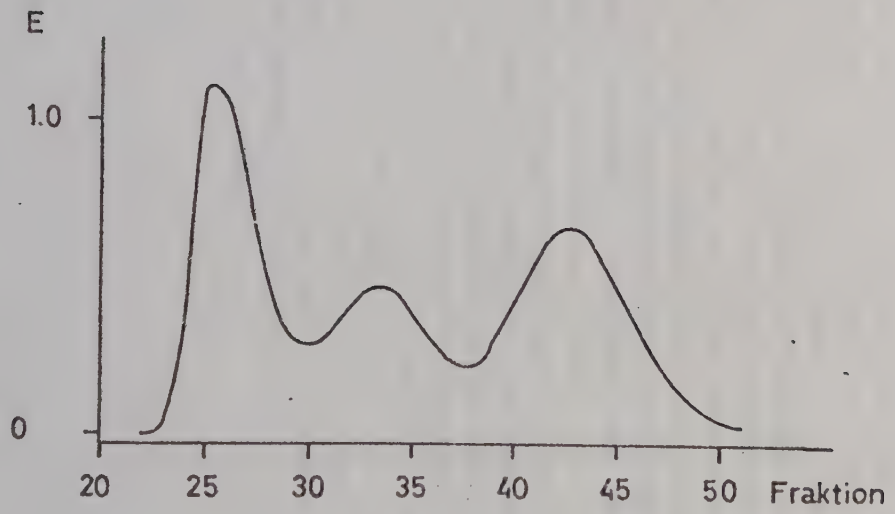

Abb.1 Trennung eines Serums an Sephadex G 2oo. E = Extinktion. In 2 Std. wurden 5 Fraktionen gesammelt.

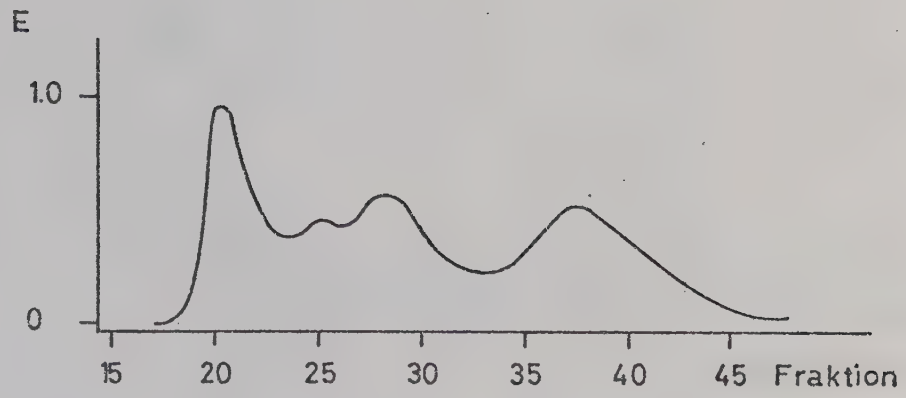

Abb.2 Trennung eines Serums mit Intermediärkomplex.

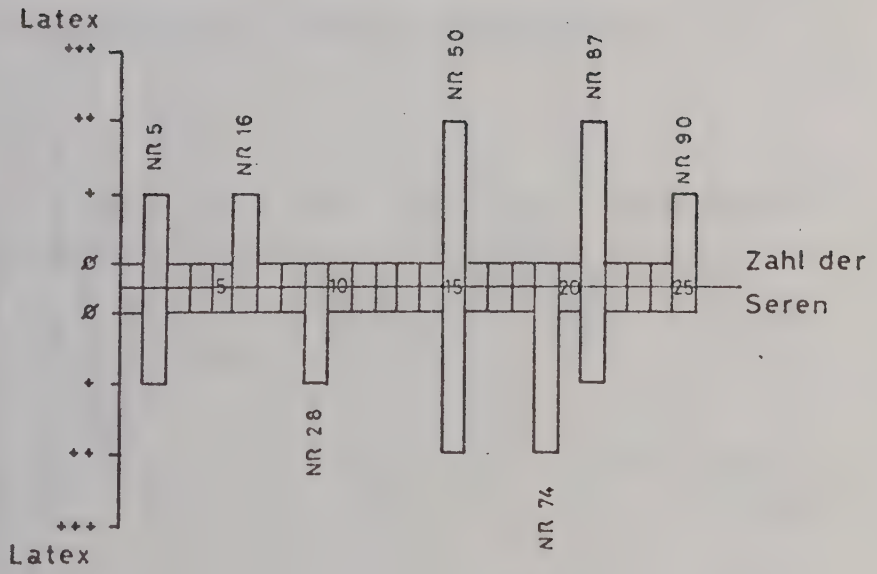

Abb.3 Obere Ordinate: IgG-Fraktionen. Untere Ordinate: Entsprechende Vollseren nach Mercaptoäthanolbehandlung.

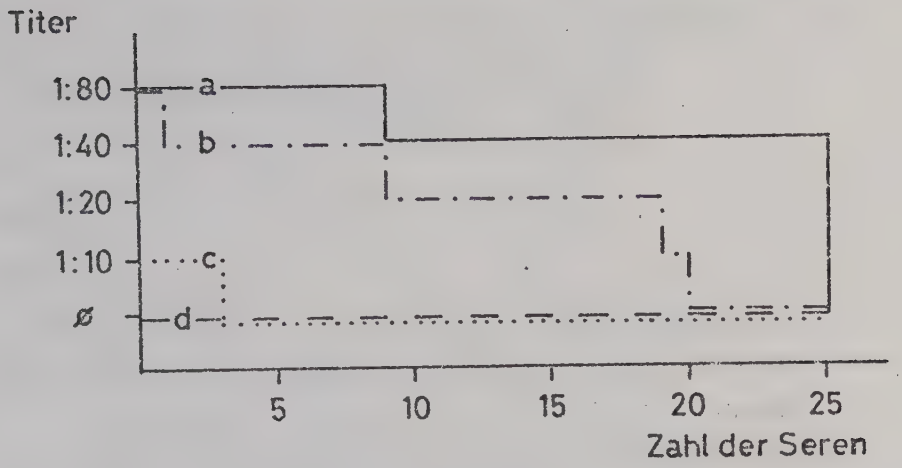

Abb.4 L-Agglutination bei den 25 Seren des Kollektivs I nach Titer geordnet und in Blöcken zusammengefaßt.
a = Vollserum, b = IgM + IgG, c = IgG, d = IgM

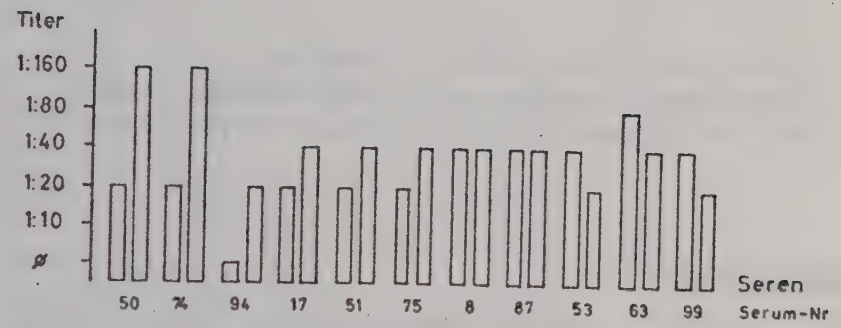

Abb.5 Titer in der L-Agglutination bei 11 Seren des Kollektivs I. Linke Säule: IgM + eigenes IgG. Rechte Säule: IgM + Normalserum.

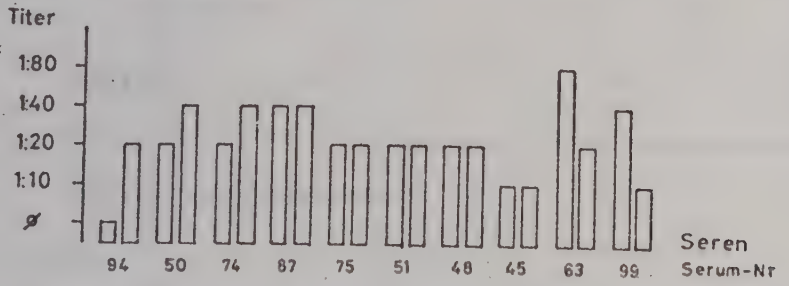

Abb.6 Titer in der L-Agglutination bei 1o Seren des Kollektivs I. Linke Säule: IgM + eigenes IgG. Rechte Säule: IgM + Normal-IgG.

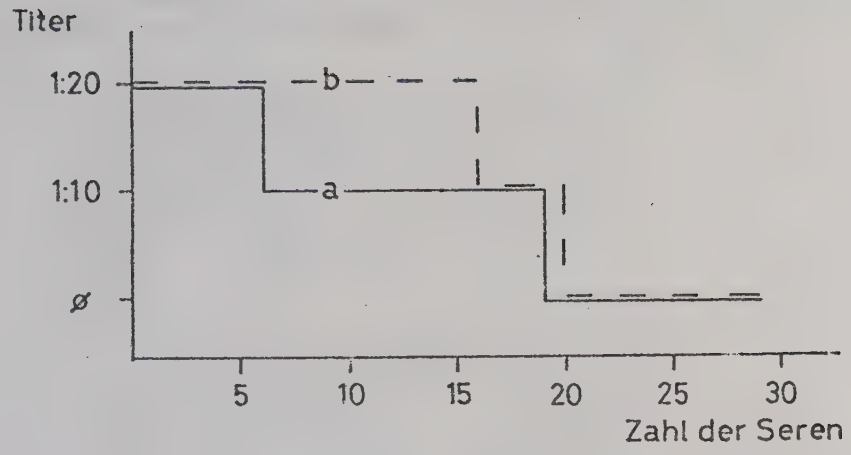

Abb.7 Titer in der L-Agglutination bei 29 Seren des Kollektivs II. a = Orginal-L-Agglutination, b = nach Zusatz von Normal-IgG.

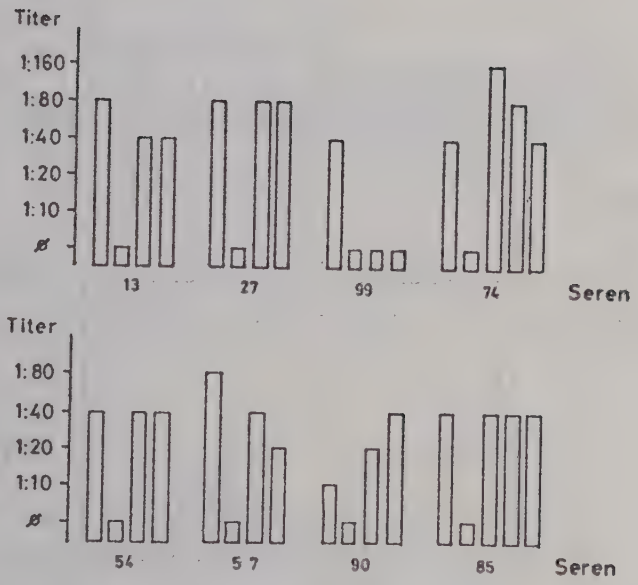

Abb.8 8 Seren in der Orginal-L-Agglutination(1.Säule), nach Absorption mit Streptokokken(2.Säule), nach Substitution des absorbierten Serums mit Normalserum(3.Säule), mit Normal-IgG(4.Säule) und in zwei Fällen mit Standard-IgG (5.Säule).

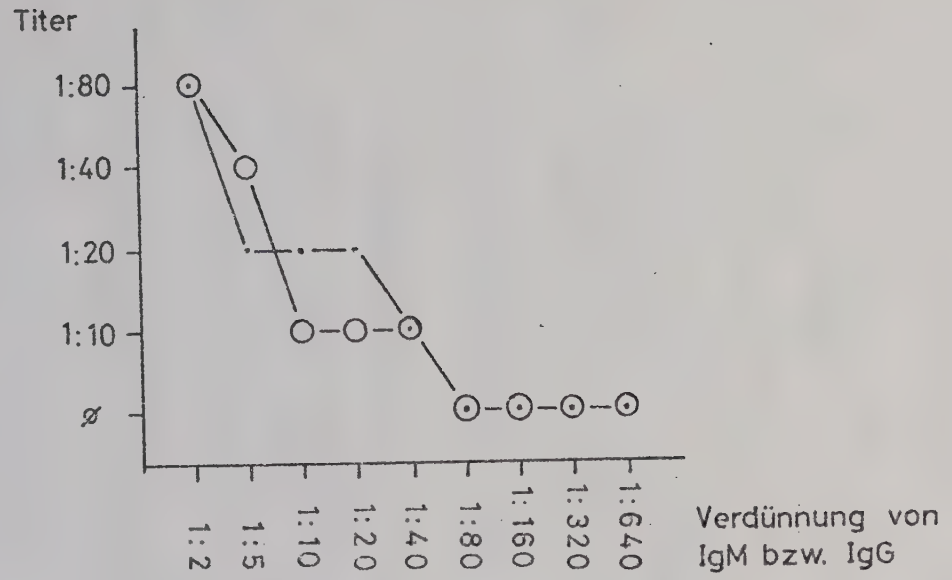

Abb.9 Titerabfall in der L-Agglutination bei Verminderung der Konzentration von IgG bzw. IgM.Punkte: IgM-Menge konstant, steigende Verdünnung von IgG. Kreise: IgG-Menge konstant, steigende Verdünnung von IgM.

VI. Literaturliste

1. Cecil, R.L., D.M.Angevine and S. Rothbard: Experimental arthritis in rabbits produced with streptococci and other organism. Amer. J. med. Sci. 198, 463 (1939)

2. Cecil, R.L., E.E.Nicholls and W.J.Stainsby: The etiology of rheumatoid arthritis. Amer. J. med. Sci. 181, 12 (1931)

3. Nicholls, E.E. and W.J. Stainsby: Streptococcal agglutinins in chronic infectious arthritis. J. clin. Invest. 1o, 331 (1931)

4. W. Müller: Die Serologie der chronischen Polyarthritis, Springer Verlag 1962

5. H. Knöll: Die Streptokokken-L-Agglutination - diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer PCP?, Zeitschr. ges. inn. Med. 24, 216 (1969)

6. Knöll, P.: Die Streptokokken L-Agglutination mit Streptokokken der Gruppe A,Typ 1,Stamm SF 13o. Z. Immunitätsforsch. 133, 351 (1967)

7. Waaler, E.: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscels. Acta path. microbiol. scand. 17, 172 (194o)

8. Ball, J.: Serum factor in rheumatoid arthritis agglutinating sensitized sheep cells. Lancet 195o, 52o

9. Heller, G., A.S.Jacobson and M.H.Kolodny: A modification of the hemagglutination test for rheumatoid arthritis. Proc. Soc. exp. Biol. 72, 316 (1949)

1o. Svartz, N.: Agglutination with sensitized sheep erythrocytes in rheumatoid arthritis. Acta. med. scand. 139, 18 (1951)

11. Singer, J.M. and C.M.Plotz: The latex fixation test. I.Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 21, 888 (1956)

12. Kalbak, K.: Ann. rheu. Dis. 7, 23o (1947)

13. Winblad, S. and G.Edström: Studies on the agglutinins against hemolytic streptococci in rheumatic diseases. Acta path. microbiol. scand. 25, 715 (1948)

14. Dawson, M.H., M.Olmstead and R.H.Boots: Agglutination reaction with streptococcus hemolyticus. J. Immunol. 23, 187 (1932)

15. Foz, A. and E.Batalla: "Autoantibodies" against human globulin in rheumatoid arthritis patients. In: Contemporary Rheumatology, herausgeg. von J.Goslings u. H.van Swaay, S.166-169. Amsterdam Elsevier publishing Comp. 1956

16. Oker-Blom, N.: Serological studies in rheumatoid arthritis. I.A comparison between the agglutination of hemolytic streptococci and certain other bacteria by sera from patients with rheumatoid arthritis. Ann. Med. exp. Penn. 26, 77 (1948)

17. Oker-Blom, N.: Om agglutination av Staphylococcus aureus vid kroniks polyarthrit. Nord.Med. 41,74(1949)

18. Wallis, A.D.: Rheumatoid arthritis. V. The agglutination of hemolytic streptococci. Amer. J. med. Sci. 213, 94 (1947)

19. Otto, R.: Zentralblatt Bakteriologie Org. 2o3,491(1967)

2o. Lamont-Havers, R.W.: Nature of serum factors causing agglutination of sensitized sheep cells and group A hemolytic streptococci. Proc. soc. exp. Biol. 88,35 (1955)

21. Svartz, N. and K.Schlossmann: A serum cold precipitable hemagglutinating factor in rheumatoid arthritis. Acta med. scand. 149, 83 (1954)

22. Knöll, P.: Die Streptokokken-L-Agglutination mit Streptokokken der Gruppe A,Typ 1,Stamm SF 13o. Zeitschr. Immunitätsf. 133, 342 (1967)

23. Knöll, P. u. E.Tanner: Serologische Studie über typenspezifische Antikörper gegen T-Proteine der hämolysierenden A-Streptokokken bei Polyarthritis chronica progressiva und degenerativen Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen. Z.Immunitätsforsch. 136, 22 (1968)

24. Legler, P.: Die Streptokokken-L-Agglutination. In: Die Rheumafaktoren, Beiträge zur Rheumatologie, Band 12, S. 43 herausgeg. von W. Keitel VEB Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin (1967)

25. Killander, J. and P.Flodin: The fractionation of proteins by gel filtration. Vox Sang. 7, 113 (1962)

26. Kunkel, H.G., H.J.Müller-Eberhard and H.H.Fudenberg: Gamma globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other diseases. J. clin. Invest. 4o, 117 (1961)

27. Kunkel, H.G., H.J.Müller-Eberhard and H.H.Fudenberg: Gamma globulin complexes in sera of certain patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, New York 3, 264 (1960)

28. Chodirker, W.B. and T.B.Tomasi: J.clin.Invest. 42, 876 (1963)

29. Svartz, N.: Experimental investigation into the hem-agglutinating factor in blood and joint fluid in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 16, 441 (1957)

30. Svartz, N.: Macroglobulins in rheumatoid arthritis. Acta Med. Scand. 158, 2(1957)

31. Svartz, N., L.A.Carlson, K.Schlossmann and A.Ehrenburg: Isolation of the rheumatoid factor. Acta Med.Scand. 160, 88 (1958)

32. Heimer, R. and F.M.Levin: On the distribution of rheumatoid factors among immunoglobulins. Immuno-chemistry 3, 1 (1966)

33. Grieble, H., G.Bach, T.Anderson and R.Zschocke: Beitrag zum Problem der Standardisierung des Latex-Fixationstests zum Nachweis des Rheumafaktors. III. Natur des Rheumafaktors im Normalserum, im Rheumatikerserum und im Serum älterer Menschen. Acta biol. med. germ. 26, 185 (1971)

34. Thulin, K.E.: The reaction of streptococcal agglutination relative to the RASfactor in rheumatoid arthritis. I. Acta rheum. scand. 1, 22 (1955)

35. Thulin, K.E.: The Reaction of streptococcal agglutination relative to the RASfactor in rheumatoid arthritis. II. Acta rheum. scand. 1, 31 (1955)

36. Thulin, K.E.: Serological reaction and the etiology of rheumatoid arthritis. Acta rheum. scand. 3,40(1957)

37. Wager, O.: On the factor producing agglutination of sensitized red cells and its relation to the agglutination of hemolytic streptococci in rheumatoid arthritis sera. Ann.Mes. exp. Fenn. 28 (Suppl. 8), 1(1950)

38. Grubb, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-Rh by certain rheumatoid arthritis sera and some other sera. The existence of human serum groups. Acta path. microbiol. scand. 39, 195 (1956)

39. Waller, M.V. and J.H.Vaughan: Use of anti-Rh sera for demonstrating agglutination activating factor in rheumatoid arthritis. Proc.Soc.exp.Biol. 92, 198 (1956)

40. Zavazal, V.: Agglutination der mit Gamma-Globulin beladenen Kollodiumteilchen bei der chronischen Polyarthritis. Z. Rheumaforsch. 17, 41 (1958)

41. Winblad, S.: Studies on different laboratory tests for the rheumatoid arthritis serum factor. I.Evaluation of different agglutination methods for whole serum, cold precipitable and euglobulin serum fractions. Acta path. microbiol.scand. 49, 499 (1960)

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. R. Wigand danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Dr.F.Legler(Erlangen), Prof.G.Bach(Bad Abbach) und Dr.A.Vogt(Freiburg) bin ich für die Bereitstellung von Seren zu Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 28.September 1948 in Köln als Sohn der Eheleute Conrad von Fragstein und Käthe von Fragstein geb. Bittner geboren. Nach vierjährigem Besuch der Grundschule trat ich Ostern 1959 in das Ludwigsgymnasium(Saarbrücken) ein. Hier legte ich im Sommer 1967 die Reifeprüfung ab und nahm im Herbst desselben Jahres mein Medizinstudium an der Universität des Saarlandes auf. Im Sommersemester 197o studierte ich in Lübeck, im folgenden Wintersemester in Mainz, dann wieder in Homburg. Hier legte ich 1973 das Staatsexamen ab.